บทที่ 6

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

อภิปรายผลการทดลอง

1. พันธุศาสตร์โมเลกุล

ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกของปลากระดูกแข็งชนิดต่างๆ โดยอาศัยข้อมูลทางพันธุศาสตร์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ Miya and Nishida (2000) ได้จัดลำดับเบสของไซโทโครมบี (cyt *b*) อยู่ในกลุ่มของยีนที่มีความสามารถในการนำมาสร้างไฟโลเจเนติกในระดับที่ดี เช่นเดียวกับยีน COII

จากรายงานทางวิชาการหลายฉบับ พบว่าลำดับเบสของบริเวณไซโทโครมบีสามารถนำมาตอบคำถามเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตในระดับสกุลหรือชนิดได้เป็นอย่างดี (interspecific level) (Brito *et al.*, 1997; Song, Near and Page, 1998; Brioley *et al.*, 1998; Burridge, 1999; Reed, deGravelle and Carpenter, 2001; Xiao *et al.*, 2001; Durand *et al.*, 2002; Casey *et al.*, 2004; Peng *et al*, 2004) แต่หากศึกษาภายในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน (intraspecific level) ลำดับเบสของบริเวณไซโทโครมบีเพียงหนึ่งยีนไม่สามารถบอกถึงความสัมพันธ์ได้ Patamello *et al.* (1994) ศึกษาการแปรผันทางพันธุกรรมของปลา *Salmo trutta* จากแม่น้ำสายต่างๆ ในประเทศอิตาลีและไอร์แลนด์ โดยอาศัยลำดับเบสของไซโทโครมบีและ 16S rRNA บางส่วน พบว่าสามารถแยกปลา *S. trutta* ที่พบในประเทศอิตาลีและไอร์แลนด์ออกจากกันได้เป็นอย่างดี และเมื่อศึกษาในระดับประชากรของปลา *S. trutta* ที่พบในแม่น้ำสายต่างๆ ในประเทศอิตาลี พบว่าลำดับเบสของทั้งสองบริเวณสามารถบอกการแปรผันและแยกประชากรปลาจากแม่น้ำสายต่างๆ ออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์

ในการศึกษาความสัมพันธ์ภายในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน (intraspecific level) นอกจากศึกษาโดยใช้ไซโทโครมบีควบคู่กับยีนบริเวณอื่น ยังสามารถใช้บริเวณลำดับเบสที่ไม่กำหนดสร้างโปรตีน (non-coding region) มาศึกษาได้เช่นกัน เช่น บริเวณ control region (Stepien and Kocher, 1997; Bower, Struffer and Kocher, 1994) เนื่องจากบริเวณยีนที่ไม่ทำหน้าที่สร้างโปรตีนจะมีอัตราการแปรผันเร็วกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับยีนที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีน Bower, Struffer and Kocher (1994) ได้นำลำดับเบสบริเวณ control region มาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมภายในชนิดของปลาหมอ rock-dwelling 2 ชนิด ซึ่งอาศัยในทะเลสาบมาลาวี ประเทศอัฟริกา และ

Brown, Beckenbach and Smith (1993) ได้ศึกษาการแปรผันของบริเวณ control region ของปลาสเตอร์เจียนขาว 27 ตัว ซึ่งอาศัยในแม่น้ำโคลัมเบียและแม่น้ำเฟรเซอร์ในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าทั้งสองรายงานให้ผลทางไฟโล เจเนติกทรีที่สามารถบ่งบอกความสัมพันธ์และการแปรผันได้เป็นอย่างดี

การศึกษาการแปรผันของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ นิยมดำเนินการ 2 รูปแบบ ได้แก่ การศึกษาการวิเคราะห์ลำดับเบส ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และการศึกษาโดยวิธีการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ หรือ RFLP (restriction fragment length polymorphism) วิธีนี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการศึกษาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต Hyne *et al.* (1989) ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 6 ชนิดตัดไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของปลาเทราท์สีน้ำตาล (*Salmo trutta*) ที่อยู่ตามธรรมชาติและปลาที่เพาะเลี้ยง พบว่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรปลาตามธรรมชาติและประชากรปลาที่เพาะเลี้ยงมีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่ารูปแบบไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ได้สามารถใช้เป็น genetic marker เพื่อวิเคราะห์แบ่งแยกประชากรปลาเทราท์สีน้ำตาลในแง่ของการแพร่กระจายและการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างประชากรปลาทั้งสองกลุ่มได้ King *et al.* (1993) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาแซลมอน (*Salmo salar* L.) ที่อาศัยในแม่น้ำสองสายที่ห่างไกลกัน โดยเก็บตัวอย่างปลาทั้งหมด 209 ตัว เพื่อศึกษาความแปรปรวนของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มปลาตามลักษณะของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเป็น 10 กลุ่ม ซึ่งการกระจายของแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันในแม่น้ำทั้งสองสาย นอกจากนั้นยังพบว่าความถี่ของการแปรผันในแต่ละกลุ่มประชากรของลูกปลากับปลาที่โตเต็มวัยในปีเดียวกันของแม่น้ำหนึ่งสายนั้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงเป็นการแสดงว่า การเปลี่ยนแปลงของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอสามารถนำมาใช้ศึกษาความอยู่รอดหรือการอพยพของปลาได้ ในขณะที่วิธี PCR-RFLP ของบริเวณไซโทโครมบีสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบการแปรผันระหว่างชนิดของสิ่งมีชีวิตต่างๆ เช่น ปลาทูน่า (Chow and Inogue, 1993) ปลา Atlantic snapper (Chow, 1993)

ไฟโลเจเนติกทรีที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้แสดงถึงความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันของปลากราย (*C. ornata*) กับปลาตองลาย (*C.blanci*) มากกว่าปลาสะตือ (*C. lopis*) ได้เป็นอย่างดี ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ของ ธวัช ดอนสกุล และวิเชียร มากตุ่น (2532) พบว่า ปลากรายมีความใกล้ชิดกับปลาตองลายมากกว่าปลาสะตือ เนื่องจากปลากรายและปลาตองลายต่างมีจำนวนโครโมโซม 2n = 42 ในขณะที่ปลาสะตือมีจำนวนโครโมโซม 2n = 38 (ธวัช ดอนสกุล, สนทนา, 20 เมษายน 2549) อย่างไรก็ดี ผลการทดลองทางไฟโลเจเนติกในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ผลที่ไม่สอดคล้องกับผลทางด้านสัณฐานวิทยา ซึ่งศึกษาโดย Roberts (1992)

ที่รายงานว่าปลาสะตือและปลาตองลายมีความใกล้ชิดกันมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบลักษณะลวดลายบนลำตัว เช่นเดียวกับการศึกษาโดยใช้ isozyme ของ พนม กระจ่างพจน์ สอดสุข, ศรีรัตน์ สอดสุข และ เฉลิมชัย สุวรรณรักษ์ (2543)

ข้อจำกัดของการศึกษาวิทยานิพนธ์ฉบับนี้คือ จำนวนตัวอย่างปลาที่ใช้ในการทดลองยังมีน้อย และแหล่งที่มาของตัวอย่างยังไม่หลากหลายเพียงพอต่อการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ภายในปลาชนิดเดียวกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปลาตองลาย และปลาสะตือ เนื่องจากปลาทั้งสองชนิดนี้หาได้ยากในแหล่งน้ำธรรมชาติ การแพร่กระจายของปลาในสกุล *Chitala* ได้มีการสำรวจครั้งล่าสุดโดย Roberts (1992) สรุปได้ว่า ปลาสกุลนี้มีเพียงปลากรายที่มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางตามแหล่งน้ำในประเทศไทย ในขณะที่ปลาตองลายและปลาสะตือไม่สามารถพบได้ทั่วไป เนื่องจากเป็นปลาที่มีถิ่นอาศัยเฉพาะ จากการสำรวจของ Bain and Humphrey (1980) ได้พิจารณาให้ปลาตองลายและปลาสะตือเป็นปลาชนิดที่หายาก อยู่ในขั้นใกล้สูญพันธุ์ (endangered) และถูกคุกคาม (threatened) ตามลำดับ แสดงว่า สถานภาพของปลาทั้งสองชนิดในแง่ของความหายากในธรรมชาตินั้น ได้เป็นที่ประจักษ์และยอมรับมาเป็นเวลานาน

ในการศึกษาทางด้านไฟโลเจเนติกทรี จำเป็นต้องมีสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่มเพื่อใช้เป็นจุดอ้างอิงเปรียบเทียบลักษณะที่พบในสิ่งมีชีวิตในกลุ่มกับสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม หลักของการเลือกสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่มคือ สิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม หรือเป็นกลุ่มใกล้เคียงกับสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม ในการทดลองนี้จึงเลือก ปลาสลาด (*N. notopterus*) ปลากรายอัฟริกา 2 ชนิด คือ *P. afer* และ *X. nigri* มาเป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม เนื่องจากปลาทั้งสามชนิดอยู่ในวงศ์ Notopteridae เช่นเดียวกับปลาในสกุล *Chitala* 3 ชนิด และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน คือ ลำตัวแบนข้าง ครีบก้นยาว (ครีบก้นและครีบหางเชื่อมต่อกัน) และครีบหลังเล็ก (Nelson, 1994) และเมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณไซโทโครมบีของปลาสลาด (AY504822) และปลากรายอัฟริกา (AY504823) และ (AF201614) ซึ่งได้จาก GenBank กับปลาสกุล *Chitala* พบว่ามีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม และเมื่อนำลำดับเบสของปลาทั้งสามชนิดไปหาค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมเปรียบเทียบกับลำดับเบสบริเวณไซโทโครมบีของปลาสกุล *Chitala* พบว่า *N. notopterus* ให้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อยกว่า *P. afer* และ *X. nigri* จึงสันนิษฐานได้ว่า *N. notopterus* เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่มที่มีความใกล้ชิดกับปลาสกุล *Chitala* มากกว่า *P. afer* และ *X. nigri*

จากข้อมูลทางไฟโลเจเนติกทรี แสดงให้เห็นว่าปลาในสกุล *Chitala* มีฐานพันธุกรรมที่แคบมาก หากในอนาคตเกิดปัญหาทางด้านสภาพแวดล้อม อาหาร หรือถิ่นที่อยู่อาศัย ปลาในสกุลนี้อาจเกิดการลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วหรือสูญพันธุ์ได้ ดังนั้นข้อมูลทางดีเอ็นเอจะสามารถช่วยใน

การวางแผนการทำประมงได้อย่างถูกต้อง และช่วยในการวางแผนการอนุรักษ์สัตว์น้ำ ในรัฐวอชิงตัน ประเทศสหรัฐอเมริกา มีการศึกษาดีเอ็นเอและ isozyme ของปลาซ็อคอาย แซลมอน (*Oncorhynchus nerka*) 2 ประชากร คือประชากรที่อาศัยในทะเลสาบและประชากรที่มีการอพยพย้ายถิ่น เนื่องจากประชากรปลาในประเภทหลังมีจำนวนน้อยลงมาก หากผลการศึกษาพบว่าพันธุกรรมของทั้ง 2 ประชากรไม่แตกต่างกัน การรณรงค์เพื่ออนุรักษ์ประชากรปลาที่อพยพย้ายถิ่นจะเป็นสิ่งที่ไม่จำเป็น (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2543)

2. เซลล์พันธุสาสตร์

ในต่างประเทศ การศึกษาโครโมโซมโดยวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวของปลามีรายงานในบทความวิชาการหลายฉบับ และปลาที่ใช้ในการทดลองส่วนมากอาศัยในเขตหนาว เช่น ปลาเทราท์สีน้ำตาล (Blaxhall, 1983) ปลาเรนโบว์ เทราท์ (Al-Sabti, 1985) ปลาแชนแนล แคทฟิช (Wolters *et al.*, 1981) ปลาทอง (Heckman and Brubaker, 1970) อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวจึงอยู่ในช่วง 20-30°C ในขณะที่อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวของปลาเขตร้อนเช่น ปลาบึก จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 °C (เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน และคณะ, 2547)

ช่วงเวลาในการเจาะเลือดของปลานับเป็นสิ่งสำคัญประการหนึ่ง ช่วงเวลาที่เหมาะแก่การเจาะเลือดปลาคือ เวลาประมาณ 10.00-11.00 นาฬิกา เนื่องจากช่วงเวลานี้ปลาจะมีการแบ่งเซลล์มากที่สุด (วีณา วิลาสเดชานนท์, 2520)

Peter Nowell (1960) ค้นพบสารไฟโทฮีมแอกกลูตินิน (T cell mitogen)ในปี ค.ศ. 1960 การเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวจึงได้นำมาใช้ในการศึกษาโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ซึ่งให้ผลการทดลองที่ดี แต่นักวิทยาศาสตร์ก็ยังพบความยากลำบากเกี่ยวกับวิธีการทดลอง Heckman and Brubaker (1970) พบว่า PHA ที่เตรียมใหม่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวของปลาทองแบ่งตัวได้ ในขณะที่ PHA ที่เตรียมเพื่อการค้าไม่สามารถเหนี่ยวนำได้ Heckman *et al.* (1971) พบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์เม็ดเลือดขาวของปลาเรนโบว์ เทราท์ขึ้นอยู่กับความอิ่มตัวของก๊าซออกซิเจนที่ใช้ในการทดลอง

Hartley and Horne (1983) จึงได้ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยใช้ปลาเรนโบว์ เทราท์เป็นสัตว์ทดลอง พบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือที่ความเข้มข้น 5% PHA และ 10% FBS เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 20 °C และพบว่าก๊าซออกซิเจนไม่มีผลกระทบและไม่มีความจำเป็นในการเจริญเติบโตของเม็ดเลือดขาวของ

ปลาเรนโบว์ เทราท์ ในขณะที่การทดลองในปลาแซลมอนและปลาคาร์ปของ Blaxhall (1983) รายงานว่าความเข้มข้น 20% FBS จะให้ค่าการแบ่งตัวของเซลล์ที่ดีที่สุด อย่างไรก็ตาม การทดลองเลี้ยงเซลล์โดยทั่วไปจะใช้ค่าความเข้มข้นของ FBS อยู่ในช่วง 10%-20% ขึ้นอยู่กับสิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการทดลอง (เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน และคณะ, 2547; Hadson *et al.*, 1980; Al-Sabti, 1985; Visoottiviseth and Chanwanna, 2001)

การแข็งตัวและการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงของปลาเป็นปัญหาสำคัญอีกหนึ่งข้อของการทดลองในครั้งนี้ Klontz and Smith (1968) ได้เขียนถึงการแข็งตัวของเลือดปลาไว้ในหนังสือ "Methods of Animal Experimentation Vol. 3" ไว้ว่า ปลามีกระบวนการการแข็งตัวของเลือดเกิดขึ้นในช่วงเวลาที่รวดเร็วมาก ประมาณ 15-45 วินาที ขึ้นอยู่กับชนิดของปลาที่นำมาทดลอง ในบางกรณีการแข็งตัวของเลือดเกิดขึ้นในเข็มฉีดยาก่อนที่เลือดจะเข้าสู่กระบอกฉีดยา ทำให้เกิดการอุดตันภายในเข็ม ดังนั้นในการศึกษาเกี่ยวกับเลือดปลาจึงจำเป็นต้องใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด โดยทั่วไปใช้ Heparin (Blaxhall and Daisley, 1973; Blaxhall, 1985) ปริมาณของ Heparin ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีขนาด 500 U ต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเข้าสู่กระบวนการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว กลับพบว่าเม็ดเลือดแดงเกิดการตกตะกอนและจับเป็นก้อนในบางครั้ง อาจเป็นไปได้ว่าปริมาณ Heparin ที่ใช้น้อยเกินไป เมื่อใส่ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารอยู่แล้ว Heparin จึงเจือจางลง

Blaxhall and Daisley (1973) ได้กล่าวถึงสาเหตุอีกประการที่มีผลต่อการศึกษาเซลล์เม็ดเลือดของปลาคือ การปนเปื้อนของเมือกปลาและน้ำที่ปลาอาศัยอยู่ แบคทีเรียที่พบมากในการเพาะเลี้ยงเซลล์ทั่วไปคือ Mycoplasma ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าหรือมองไม่เห็น โดยจะปนเปื้อนมากับอาหารเลี้ยงเซลล์ เซรั่ม ทริปซิน หรือขั้นตอนกระบวนการต่างๆ

จากการศึกษาโครโมโซมโดยวิธีกดให้แบนในปลากราย (*C. ornata*) พบว่าโครโมโซมที่นับได้มีจำนวนประมาณ 2n = 42 เนื่องจากโครโมโซมที่ได้ยังมีการซ้อนทับกัน และการกระจายตัวยังไม่ดีพอทำให้ไม่สามารถบอกจำนวนที่แท้จริงได้ แต่ผลการทดลองนี้ให้ผลใกล้เคียงกับผลการทดลองของ ธวัช ดอนสกุล และ วิเชียร มากตุ่น (2532) ซึ่งรายงานจำนวนโครโมโซมของปลากราย 2n = 42

การศึกษาลักษณะโครโมโซมที่ได้จากการกดเซลล์ครีบหางให้แบน ไม่จำเป็นต้องฆ่าปลา ซึ่งจะเหมาะสมกับปลาที่หายากและมีขนาดใหญ่พอสมควรได้ รวมทั้งจำเป็นต้องอนุรักษ์ไว้เพื่อเป็นพ่อแม่พันธุ์ นอกจากนั้นระยะเวลาที่ใช้ในการทดลองน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว คือประมาณ 1 วัน และเสียค่าใช้จ่ายน้อย (Blaxhall, 1975) การทดลองในปลาที่อายุยังไม่มากนักจะสามารถเห็นโครโมโซมระยะเมทาเฟสได้มากกว่าปลาที่อายุมากแล้ว เนื่องจากปลาที่อายุน้อยมีการ

แบ่งเซลล์มากเพื่อให้ร่างกายเจริญเติบโต (วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, สนทนา, 9 มกราคม 2548) ผลการศึกษาดังกล่าวจะเป็นประโยชน์ทางด้านพันธุกรรม การจัดการพ่อแม่พันธุ์และอนุกรมวิธานต่อไปในอนาคต

ครีบหางที่ตัดไปทำการทดลองจะสามารถงอกใหม่ได้ภายใน 2-3 วัน แต่เพื่อให้ได้ครีบหางที่มีขนาดกว้างพอที่จะนำไปทดลองควรใช้เวลาประมาณ 1 อาทิตย์ ครีบหางที่งอกใหม่จะมีสีที่อ่อนกว่าครีบบริเวณอื่นและสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Denton, 1973)

ปัญหาที่พบในการศึกษาโครโมโซมโดยวิธีกดให้แบนนั้นคือ ได้จำนวนเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟสน้อย Drewry (1964) ใช้วิธีทำให้ปลาที่จะทดลองมีอาการบาดเจ็บ เพื่อให้ร่างกายปลามีการสร้างเซลล์ขึ้นมาทดแทน ในขณะที่ Sick *et al.* (1962) ใช้วิธีฉีดสารละลายโคลชิซีนเข้าสู่ตัวปลา แต่วิธีนี้ไม่เหมาะกับชนิดของปลาที่มีอยู่น้อย เนื่องจากทำให้ปลาเสียชีวิต

ปัญหาที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากการเตรียมสไลด์ที่ไม่ชำนาญเพียงพอ เช่น โครโมโซมเกาะตัวแน่น เกิดจากการใช้เวลาในการทำให้เซลล์พองตัวน้อยเกินไป เซลล์เกาะตัวกันเป็นก้อน เกิดจากการคงสภาพเซลล์ไม่ดีพอ มีเกล็ดสีอยู่บนสไลด์ แก้ปัญหาโดยนำสีย้อมไปกรองด้วยกระดาษกรอง มองเห็นเซลล์สว่างหรือมืดเกินไป เกิดจากการใช้เวลาในการย้อมสีน้อยหรือมากเกินไป (Denton, 1973) เพราะฉะนั้นการทำสไลด์ให้สวยงามได้นั้น ต้องอาศัยเวลาและทักษะการฝึกฝนให้มีความชำนาญต่อไป

สรุปผลการทดลอง

1. พันธุศาสตรโมเลกุล

จากการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณไซโทโครมบี โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่ดัดแปลงมาจาก Brito *et al.* (1997) ซึ่งใช้ในการทดลองของปลาสกุล *Leuciscus* พบว่าได้แถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของปลาสกุล *Chitala* มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส

การศึกษาการแปรผันทางพันธุกรรมของปลาสกุล *Chitala* ที่พบในประเทศไทยโดยอาศัยลำดับเบสของบริเวณไซโทโครมบี โดยวิธี neighbor-joining และ maximum parsimony พบว่าทั้งสองวิธีสามารถบอกความสัมพันธ์ของปลาทั้ง 3 ชนิดได้เป็นอย่างดี (interspecific level) โดยปลากราย (*C. ornata*) มีความสัมพันธ์กับปลาตองลาย (*C. blanci*) มากกว่าปลาสะตือ (*C. lopis*) แต่หากพิจารณาความสัมพันธ์ภายในกลุ่มของปลากรายที่มีแหล่งที่มาจากแหล่งน้ำและจังหวัดต่างกัน (intraspecific level) ลำดับเบสของบริเวณไซโทโครมบีไม่สามารถบอกถึงความสัมพันธ์ได้ จำเป็นต้องศึกษาควบคู่ไปกับลำดับเบสบริเวณที่ไม่กำหนดการสร้างโปรตีน เช่น บริเวณ 16S rRNA และบริเวณ control region

จากข้อมูลทางไฟโลเจเนติกทรี แสดงให้เห็นว่าปลาในสกุล *Chitala* มีฐานพันธุกรรมที่แคบมาก หากในอนาคตเกิดปัญหาซึ่งส่งผลกระทบโดยตรงต่อประชากรปลา ปลาในสกุลนี้อาจเกิดการลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วหรือสูญพันธุ์ได้ ดังนั้นข้อมูลการแปรผันทางพันธุกรรมของปลากลุ่มนี้ จะ

ก้อนของเม็ดเลือดแดง หรือพบแต่เม็ดเลือดแดง และในบางครั้งพบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย จึงเปลี่ยนวิธีการศึกษาโดยใช้การขูดเซลล์ครีบหางและนำมากดให้แบน หรือเรียกว่า วิธี squash ในครั้งนี้ได้ทดลองในปลากรายและปลาตองลาย แต่ได้ผลโครโมโซมของปลากรายเพียงชนิดเดียวเท่านั้น จำนวนโครโมโซมโดยประมาณของปลากรายที่นับได้คือ 2n=42แต่ไม่สามารถนำมาจัดคาริโอไทป์ได้ เนื่องจากโครโมโซมที่ได้มีขนาดเล็ก และยังไม่กระจายดีเท่าที่ควร นอกจากนี้จำนวนเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟสที่พบในการทดลองมีไม่มากพอ การศึกษาจำนวนและรูปร่างของโครโมโซมโดยวิธีกดให้แบนโดยใช้ครีบหางนั้น พบว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมกับปลาที่หายาก เนื่องจากไม่ทำให้ปลาเสียชีวิต นอกจากนี้ ส่วนหางบริเวณที่ถูกตัดจะสามารถงอกใหม่ภายในเวลา 2-3 วันและสามารถตัดหางบริเวณนั้นมาศึกษาโครโมโซมต่อไปได้